ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201711.01785v1

基于宏基因组学技术检测全株玉米青贮期间和曝露空气后的微生物多样性

胡宗福　常　杰　萨仁呼　王思珍　牛化欣*

(内蒙古民族大学动物科学技术学院，通辽 028000)

摘　要：本试验旨在分析全株玉米青贮发酵期间和曝露空气后的发酵品质及微生物多样性，监测其微生物群落组成动态变化。试验分别在 3 个发酵时期取样，即青贮第 5 天(F5 组)、青贮第 40 天(F40 组)和青贮 40 d 开袋曝露空气后第 3 天(A3 组)，每次取 3 袋作为 3 个重复。采用宏基因组学技术，测定全株玉米青贮发酵期间和曝露空气后微生物的 16S rDNA V3～V4 区序列，比较 3 个发酵时期样品微生物群落的组成和丰度信息，通过 Alpha 多样性和主成分分析，考察和比较全株玉米青贮发酵和曝露空气后的微生物多样性。结果表明：全株玉米经过 40 d 的青贮发酵，可使 pH 及中性洗涤纤维（NDF）和酸性洗涤纤维（ADF）含量显著下降（P<0.05），乳酸含量显著升高（P<0.05），具有良好的发酵品质和营养价值，且发酵 40 d 后短时间开袋暴露空气对其发酵品质和营养价值无显著影响（P>0.05）。3 组样本通过 Illumina Miseq 测序平台共获得 122 371 条高质量有效序列，聚类为 239 个操作分类单元，经分类学鉴定分属 16 个门，163 个属。在门水平上，厚壁菌门（*Firmicutes*）始终占优势地位，其丰度在 F5、F40 和 A3 组中分别为 57.57%、74.65%、78.82%，呈增长趋势。发酵前期（F5 组）、发酵后期（F40 组）和曝气期（A3 组）优势菌属均为乳杆菌属（*Lactobacillus*），其丰度分别为 49.78%、64.46%和 45.34%，但在曝气期芽孢乳杆菌属（*Sporolactobacillus*）的比例上升明显，至 28.46%。综上，全株玉米青贮自然发酵升高了产乳酸乳杆菌属的丰度，有利于提高全株玉米青贮的发酵品质，但开袋暴露空气 3 d 对全株玉米青贮的微生物多样性产生了影响，而通过 Miseq 高通量测序技术，能够全面了解全株玉米青贮期间和曝露空气后微生物群落组成及丰度上的变化。

关键词：青贮；全株玉米；宏基因组学；微生物多样性；发酵品质

中图分类号：S816.5　　　文献标志码：A　　　文章编号：

青贮饲料是反刍动物营养和饲料十分重要的来源之一，尤其对冬季较长地区的反刍动物

收稿日期：2017-04-29

资助项目：国家自然科学基金项目(31160474)；优质肉牛生产核心技术研究与示范创业人才团队资助项目

作者简介：胡宗福(1979—)，男，内蒙古呼伦贝尔人，讲师，博士研究生，从事动物营养与饲料研究。E-mail: huzongfusohu@163.com

*通信作者：牛化欣，教授，硕士生导师，E-mail: niuhx@imun.edu.cn

ChinaXiv合作期刊

更为重要。而全株玉米青贮是反刍动物最重要的青贮饲料之一，在欧、美等发达地区早已广泛应用[1-2]。随着我国农业结构战略性调整和畜牧业的快速发展，大力推进全株青贮玉米的种植和利用微生物发酵技术青贮饲料，提高青贮饲料品质、增加畜牧生产性能、改善畜牧产品质量是非常重要的[3-4]。因此，在青贮过程中微生物的组成、变化及其对青贮饲料发酵品质的重要影响更是研究者关注的焦点。

多年来，青贮中微生物多样性及群落变化的研究常用的传统培养法，由于培养条件的局限性，传统培养法存在费时、费力、片面的缺陷，无法真正完全解析微生物的组成、丰度及其变化情况，低估了微生物的多样性[5]。近 10 多年来，随着分子生物学技术的不断发展，基于聚合酶链式反应(PCR)技术出现了许多非培养的方法，如 16S rRNA 克隆建库、限制性片段长度多态性(RFLP)、变性梯度凝胶电泳 PCR(DGGE-PCR)等，这些方法被广泛应用于环境、发酵食品、青贮饲料及其他微生态环境中微生物多样性的研究[6-8]。基于微生物宏基因组学的高通量焦磷酸测序技术具有高通量、快速、省力等优点，已逐渐被广泛应用于土壤、肠道、水体、发酵食品等各微生态环境中微生物多样性的检测和研究[9-11]。然而，高通量焦磷酸测序技术在青贮发酵饲料方面应用的研究方面报道较少。Li 等[12]利用高通量测序技术在青贮过程中检测到 30 多个菌属群落结构的变化情况。刘晶晶[13]应用 Miseq 高通量测序技术在柳枝稷青贮 60 d 时检测微生物多样性。陶莲等[14]通过实验室检测手段和 Miseq 高通量测序技术相结合，分析了青贮饲料品质和青贮前后整个菌落构成及丰度变化的信息，进而为发酵过程的认清微生物组成提供了依据。Bao 等[15]利用第 3 代单分子测序技术(SMRT)检测了苜蓿青贮前后微生物组成的变化及其对苜蓿品质的影响，表明 SMRT 测序平台可用于评估青贮饲料微生物组成变化和青贮饲料品质。然而，采用高通量测序技术检测和分析全株玉米青贮过程中微生物多样性还未有报道。因此，本试验利用宏基因组学技术，研究和分析全株玉米青贮发酵过程中和发酵后曝露空气后菌群构成及其演替规律，为全面了解全株玉米自然青贮发酵过程中微生物组成及变化、发掘全株玉米附生有益微生物种类、提高青贮饲料营养价值和品质提供理论基础和新方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料及样品采集

全株玉米来源于内蒙古通辽市查金台第一农场，取自机械化收割后的样品（收割后的全株玉米由机器自动切割成长度为 1～2 cm 的小段）。青贮试验于 2016 年 9 月在内蒙古民族大学动物科学技术学院实验室进行。将样品装入双层聚乙烯袋（45 cm×30 cm）中，排空气、压实、封口，每袋约 3.0 kg，压实密度约 550 kg/m^3，将青贮发酵袋装于塑料贮存箱内室温

chinaXiv:201711.01785v1

发酵。分别在青贮第 5 天(F5 组)、青贮第 40 天(F40 组)和青贮 40 d 开袋曝露空气后第 3 天(A3 组)进行取样，每次取 3 袋作为重复，共 9 袋，取样时打开袋，上层弃用，取袋中间位置的样品，一部分装入无菌 50 mL 冻存离心管中，于-80 ℃超低温冰箱保存，用于微生物多样性检测；另一部分（约 60 g）装入封口袋中，保存于-20 ℃冰箱，用于青贮发酵品质和营养成分的测定。

1.2 全株玉米青贮发酵品质和营养成分的测定

取全株玉米青贮 3 个阶段点样品各 20 g，加入 180 mL 蒸馏水，搅拌均匀，用组织捣碎机搅碎 1 min，先后用 4 层纱布和定性滤纸过滤，滤出草渣得到浸出液，将其分为 4 份，分别采用 pH 计、苯酚-次氯酸钠比色法、对羟基联苯比色法和中和滴定法测定 pH 及氨态氮(AN)[14]、乙酸和乳酸[16]含量。参考文献[17]的描述，分别采用烘箱干燥法、凯氏定氮法、范氏洗涤纤维法分别测定全株玉米青贮的干物质（DM）、总氮（TN）、粗蛋白质（CP）、中性洗涤纤维（NDF）和酸性洗涤纤维（ADF）含量；采用蒽酮分光光度法[18]测定全株玉米青贮的水溶性碳水化合物（WSC）含量。

1.3 青贮饲料微生物宏基因组测序方法

1.3.1 细菌基因组 DNA 的提取

将以上每次取的 3 个重复样品混合在一起，按照 FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals，Santa Ana，CA，美国)试剂盒的步骤说明，抽提青贮饲料中的细菌基因组 DNA。对抽提到的基因组 DNA 采用紫外分光光度计进行浓度和纯度检测，并采用 0.8%琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 完整性检测。

1.3.2 16S rDNA 的扩增

使用细菌 16S rRNA 基因 V3～V4 区引物 338F(ACTCCTACGGGAGGCAGCA)及 806R(GGACTACHVGGGTWTCTAAT)[19]，对以上获得 DNA 模板进行序列扩增。

PCR 反应体系为 20 μL，包括 4.0 μL 的 5×FastPfu Buffer，2.0 μL 的 dNTPs(dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP 各 2.5 mmol/L)，0.4 μL 的 FastPfu DNA Polymerase，20.0 μL 模板 DNA，0.8 μL 正向引物 338F(5 μmol/L)，0.8 μL 的反向引物 806R(5 μmol/L)，0.2 μL 的胎牛血清(BSA)(0.1%)，由灭菌 ddH_2O 补至 20 μL。95 ℃预变性 3 min，95 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 45 s，反应循环数为 27，最后 72 ℃延伸 10 min。

1.3.3 测序

使用 2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，如果产物浓度合适，目的条带大小正确，则进行上机测序。测序系统采用 Illumina Miseq 测序平台（Illumina Corporation，San Diego，美

chinaXiv:201711.01785v1

国)，测序公司为上海美吉生物医药科技有限责任公司。

1.3.4 生物信息学和数据分析

1.3.4.1 原始双端序列的拼接与质控

这一过程主要涉及杂质 reads 的去除及双端序列的拼接，所用软件为 FLASH 及 Trimmomatic。首先对 reads 尾部 50 bp 窗口内平均质量值低于 20 的窗口碱基进行截除，之后对 50 bp 以下的 reads 进行过滤，并去除含 N 碱基的 reads。拼接主要根据测序所得的双端序列之间的重叠关系将成对 reads 拼接成一条，要求最小重叠数大于 10 bp，碱基错配率低于 0.2%。最后根据序列两端的 barcode 及引物区分样本得到有效序列，不允许 barcode 有错配。

1.3.4.2 序列过滤及操作分类单元（OTU）聚类

使用 Usearch（vsesion 7.0 http://drive5.com/uparse/）软件平台进行序列过滤及 OTU 聚类。对 1.3.3 获得的有效序列进行非重复序列的冗余分析，去除没有重复的单序列，获得优化序列。按照序列 97%相似性的原则对优化序列进行 OTU 聚类，过程中去除嵌合体，生成 OTU 代表序列，并与优化序列比对产生 OTU 表格。

1.3.4.3 生物信息学分析

物种分类学采用 RDP classifier 贝叶斯算法（version 2.2，http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/）及 Qiime 平台（http://qiime.org/scripts/assign_taxonomy.html）进行分析，设 0.7 为置信度阈值。将 OTU 代表序列与 Silva 数据库（Release128，http://www.arb-silva.de）进行 BLAST 比对，获得 OTU 代表序列的分类学信息，分别在各分类学水平上分析各样本的群落组成。

采用 mothur 软件平台 (version v.1.30.1，http://www.mothur.org/wiki/Schloss_SOP#Alpha_diversity)进行稀释曲线及 Alpha 多样性分析。Venn 图、Heatmap 和主成分分析（PCA）均采用 R 语言相关软件包进行分析及作图。

2 结　果

2.1 全株玉米青贮期间和暴露空气后发酵品质及营养成分变化

由表 1 可知，相比青贮第 5 天，全株玉米青贮第 40 天和青贮 40 d 后开袋第 3 天，氨态氮/总氮、乳酸和乙酸含量均有显著增加（P<0.05），但 pH 有相反趋势，出现显著降低（P<0.05），且青贮第 40 天和青贮 40 d 后开袋第 3 天之间差异不显著（P>0.05）。全株玉米青贮前、青贮第 5 天、青贮第 40 天、青贮 40 d 后开袋第 3 天营养成分变化结果（表 1）表明，随着青贮时间的延长，全株玉米 DM、CP、NDF、ADF 和 WSC 含量均有减少的趋势，开袋后第 3

chinaXiv:201711.01785v1

天虽略有升高，但与青贮 40 d 后差异不显著（$P>0.05$），其中 WSC 含量下降的最明显，与青贮前相比，青贮第 5 天、青贮第 40 天、青贮 40 d 后开袋第 3 天比青贮前分别下降了 38.60%、68.17%和 65.86%，差异均达到显著水平（$P<0.05$）。

表 1 全株玉米青贮期间和暴露空气后的发酵品质及营养成分

Table 1 Fermentation quality and nutritional components of whole-plant maize during ensilage and after air exposure

项目 Items	青贮前 Pre-ensiling	青贮第 5 天 Day 5 in ensilage	青贮第 40 天 Day 40 in ensilage	青贮 40 d 后开袋第 3 天 Opened on day 3 after ensilage for 40 days
发酵品质 Fermentation quality				
氨态氮/总氮 AN/TN/(%)		4.33±1.05^{b}	7.95±0.47^{a}	8.05±1.21^{a}
pH		4.08±0.32^{a}	3.83±0.08^{b}	3.91±0.10^{b}
乳酸 LA/% DM		4.83±0.21^{b}	9.69±0.26^{a}	9.16±0.44^{a}
乙酸 AA /% DM		0.48±0.02^{c}	1.53±0.43^{b}	2.48±0.61^{a}
营养成分 Nutritional components				
干物质 DM/%	32.89±0.65^{a}	32.11±1.04^{a}	30.59±0.46^{b}	31.37±1.27^{ab}
粗蛋白质 CP/% DM	8.95±0.63^{a}	8.52±0.16^{a}	7.22±0.74^{b}	7.26±0.55^{b}
中性洗涤纤维 NDF/% DM	58.14±2.05^{a}	53.71±2.12^{b}	49.66±1.16^{c}	49.43±2.20^{c}
酸性洗涤纤维 ADF/% DM	45.47±1.89^{a}	41.22±1.47^{b}	32.75±1.10^{c}	33.20±1.32^{c}
水溶性碳水化合物 WSC/% DM	17.72±1.08^{a}	10.88±1.23^{b}	5.64±0.24^{c}	6.05±0.16^{c}

同行数据肩标不同字母表示差异显著（$P<0.05$）。

In the same row, values with different letter superscripts indicated significant difference ($P<0.05$).

2.2 序列过滤与质控

通过序列过滤、抽取及双端拼接，3 组样本共获得了 122 371 条有效序列，总碱基数 54 758 721 个，平均长度 447 bp，经过对有效序列的优化处理，得到共 110 173 条优化序列用于 OTU 聚类及分类学分析，有效优化序列数目达 90.03%（表 2）。

经过序列相似性大于 97%水平上的 OTU 聚类，共得到的 OTU 的数目为 239，单个样本中序列丰度大于 1%的 OUT 的数目却很少，分别是 12（F5 组）、8（F40 组）和 10（A3 组）。3 个样本的覆盖度均达到了 0.99 以上，稀释曲线及 shannon 曲线（图 1）均显示曲线已经趋于平坦，表明样本测序量已经饱和，足够反映样本中绝大部分细菌物种的信息。有效序列及优化序列数随青贮时间延长而升高，同时 OTU 数目也在增加，说明青贮期间及开袋暴露空

chinaXiv:201711.01785v1

chinaXiv:201711.01785v1

气后菌群持续增殖，多样性也在增加。但样本中序列丰度大于 1%的 OTU 的数目不仅减少，还出现青贮后期比青贮前期的低的情况，说明青贮对于主体菌群来说多样性是降低的。

表 2　不同样本序列信息

Table 2　Sequence information of different samples

组别 Groups	有效序列数量 Effective sequence No./条	优质序列数量 High quality sequence No./条	优化比例 Optimization ratio/%	序列长度 Sequence length/bp	操作分类单元数目 OUT No.	序列丰度大于 1%的操作分类单元数目 OUT No. for sequence abundance >1%	覆盖度 Coverage
F5	34 175	29 975	87.71	446	189	12	0.999 2
F40	43 901	38 455	87.59	448	214	8	0.999 4
A3	44 295	41 743	94.24	447	222	10	0.999 7

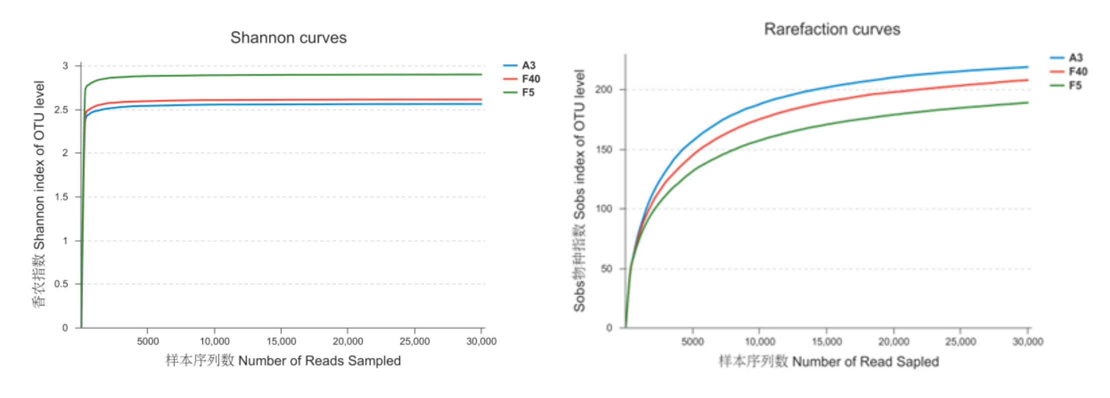


图 1　全株玉米青贮和暴露空气样本稀释曲线（A）及 shannon 曲线(B)

Fig.1　Rarefaction curves （A） and Shannon curves (B) of samples from whole-plant maize during ensilage and after air exposure

2.2 全株玉米青贮期间和暴露空气后微生物群落主成分分析

由图 2 的主成分分析可知，A3、F40 和 F5 组三者彼此距离互不接近，形成了一个三角形，表明在三者在微生物组成上有很大的差别，三者分别代表了不同的发酵时期，即发酵初期（F5 组）、发酵后期（F40 组）及曝气期（A3 组）。F40 组分别与 A3 及 F5 组距离较近，说明三者相比，发酵后期分别与发酵初期及曝气期微生物群落构成相似性较大，也表明发酵初期、发酵后期和曝气期三者之间的承继关系。

chinaXiv:201711.01785v1

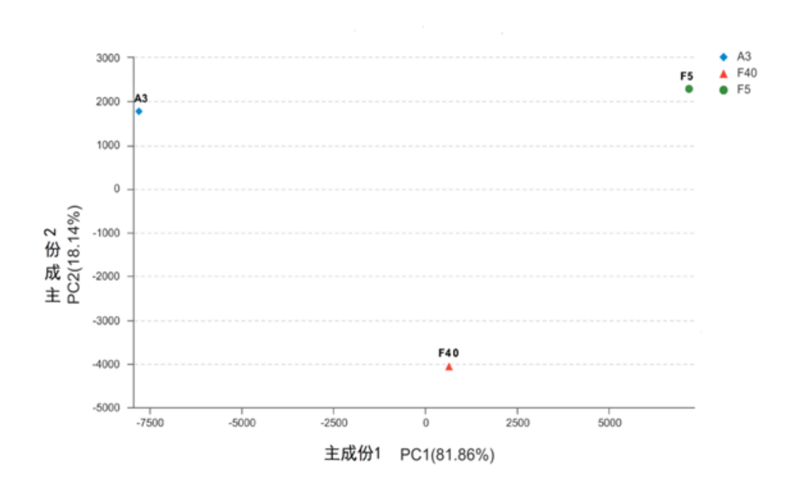
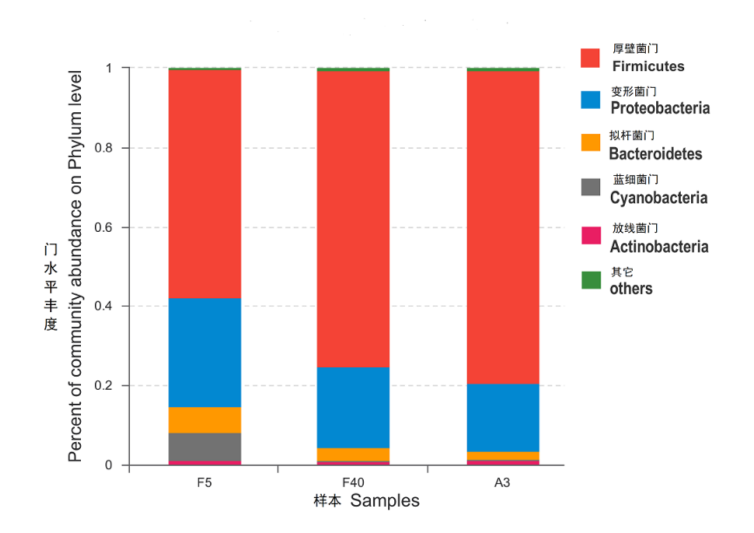


图 2　全株玉米青贮期间和暴露空气后微生物群落主成分分析(OUT 水平)

Fig.2　Principal component analysis of microbial community from whole-plant maize during ensilage and after air exposure (OUT level)

2.3 基于门水平的微生物群落结构分析



Firmicutes：厚壁菌门；Proteobacteria：变形菌门；Bacteroidetes：拟杆菌门；Cyanobacteria：蓝细菌门；Actinobacteria：放线菌门。

图 3　基于门水平的全株玉米青贮期间和暴露空气后微生物群落结构

Fig.3　Microbial community structure of whole-plant maize during ensilage and after air exposure on the phylum level

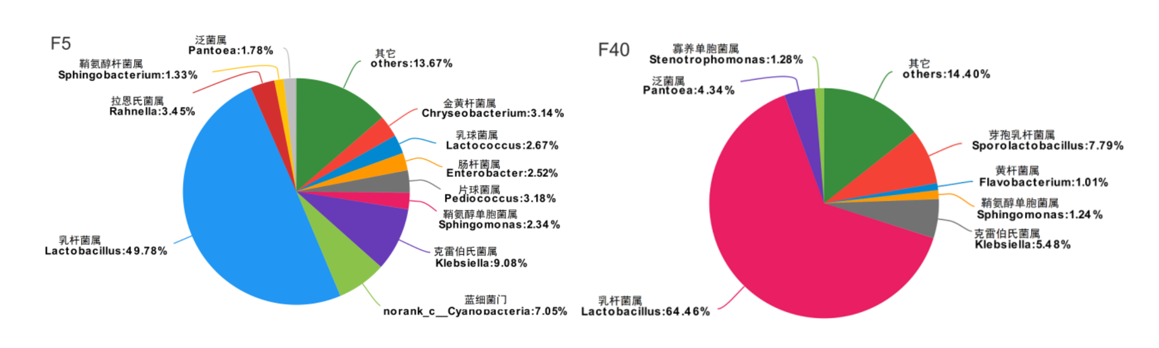
经过序列相似性大于 97%水平上的 OTU 聚类，共获得了 239 个 OTU，分属 163 个属，93 个科，54 个目，26 个纲，16 个门。所有样本的微生物群落可分为 16 个门，如图 3 所示，丰度大于 1%的门有 5 个，依次为厚壁菌门（Firmicutes）、变形菌门（Proteobacteria）、拟杆菌门（Bacteroidetes）、蓝细菌门（Cyanobacteria）和放线菌门(Actinobacteria)，它们占了极

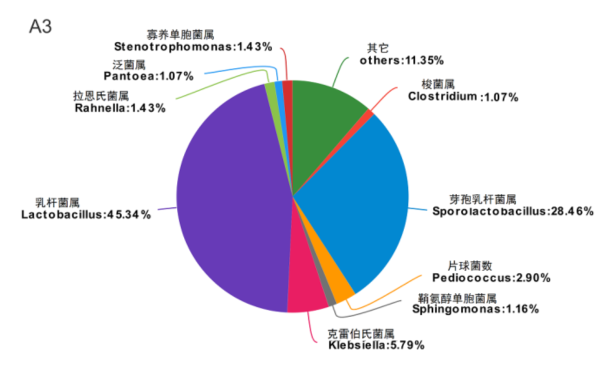
大的比例。发酵初期（F5 组）中主要优势菌群为厚壁菌门和变形菌门，分别占到 57.57%和 27.54%，其次是蓝细菌门(7.05%)、拟杆菌门(6.49%)和放线菌门（1.08%），它们的总丰度达到 99.73%。发酵后期（F40 组）中主要有 3 个门的丰度在 1%以上，它们是厚壁菌门、变形菌门和拟杆菌门，分别占到 74.65%、20.36%和 3.10%，这 3 个门菌群的总丰度达到 98.10%。曝气期（A3 组）中主要优势菌群为厚壁菌门和变形菌门，丰度分别为 78.82%和 17.02%，其次是拟杆菌门和放线菌门，丰度分别是 2.17%和 1.20%，这 4 个门菌落的总丰度达到 99.21%。

比较不同发酵时期的 3 个样本可知，随着青贮的进行及后续开袋暴露空气，厚壁菌门获得了持续增长，变形菌门和拟杆菌门所占比例持续降低，蓝细菌门只在 F5 组中出现，放线菌门只在发酵初期和曝气期丰度高于 1%。

2.4 基于属水平的微生物群落结构分析

图 4 显示了在属水平上全株玉米青贮期间及曝露空气后微生物群落结构的变化（丰度>1%），3 个样本共鉴定出 163 个属。





Lactobacillus:乳杆菌属；*Klebsiella*:克雷伯氏菌属；*Rahnella*:拉恩菌属；*Chryseobacterium*:金黄杆菌属；*Pediococcus*:片球菌属；*Lactococcus*:乳球菌属；*Enterobacter*:肠杆菌属；*Sphingomonas*:鞘氨醇单胞菌属；*Pantoea*:泛菌属；*Sphingobacterium*:鞘氨醇杆菌属；*Sporolactobacillus*:芽孢乳杆菌属；*Stenotrophomonas*:寡养单胞菌属；*Flavobacterium*:黄杆菌属；*Clostridium*:梭菌属。

chinaXiv:201711.01785v1

图 4　基于属水平的全株玉米青贮期间和暴露空气后微生物群落结构

Fig.4　Microbial community structure of whole-plant maize during ensilage and after air exposure on the genus level

发酵初期（F5 组）鉴定出 133 个属，丰度>1%的菌属有 11 个(含蓝细菌门)，总丰度占到 86.33%，其中乳杆菌属(*Lactobacillus*)占优势地位，丰度达 49.78%，随后依次为克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）（9.08%）、蓝细菌门（7.05%）、拉恩氏菌属（*Rahnella*）（3.45%）、金黄杆菌属（*Chryseobacterium*）（3.14%）、片球菌属（*Pediococcus*）（3.18%）、乳球菌属（*Lactococcus*）（2.67%）、肠杆菌属（*Enterobacter*）（2.52%）、鞘氨醇单胞菌属（*Sphingomonas*）（2.34%）、泛菌属（*Pantoea*）（1.78%）、鞘氨醇杆菌属（*Sphingobacterium*）（1.33%），可见其他的菌属虽然丰度不大，但具有一定的数量。

发酵后期（F40 组）鉴定出 146 个属，丰度>1%的菌属有 7 个，总丰度占到 85.60%，其中乳杆菌属占优势地位，丰度达 64.46%，随后依次为芽孢乳杆菌属（*Sporolactobacillus*）（7.79%）、克雷伯氏菌属（5.48%）、泛菌属（4.34%）、寡养单胞菌属（*Stenotrophomonas*）（1.28%）、鞘氨醇单胞菌属（1.24%）、黄杆菌属（*Flavobacterium*）（1.01%）。

曝气期（A3 组）鉴定出 153 个属，丰度>1%的属有 9 个，总丰度占到 88.65%，主要种类有乳杆菌属（45.34%）、芽孢乳杆菌属（28.46%）、克雷伯氏菌属（5.79%）、片球菌属（2.90%）、寡养单胞菌属（1.43%）、拉恩氏菌属（1.43%）、鞘氨醇单胞菌属（1.16%）、泛菌属（1.07%）、梭菌属（*Clostridium*）（1.07%）。

发酵初期、发酵后期、曝气期乳杆菌属的丰度分别是 49.78%、64.46%、45.34%，占绝对优势，在青贮期间丰度呈增长趋势，在青贮 40 d 达到峰值，在开袋暴露空气后丰度有所下降，而芽胞乳杆菌属，由发酵初期未出现，到发酵后期的 7.79%，再到开袋暴露空气 3 d 后增长到 28.46%，说明暴露空气有利于其生长。其他一些菌属则相对稳定而又连续存在，其中克雷伯氏菌属丰度相对较大，发酵初期、发酵后期和曝气期的丰度分别是 9.08%、5.48% 和 5.79%，梭菌属在发酵期间检测不到而在开袋暴露空气 3 d 后增长到 1.07%。此外，丰度相对较小的菌属还包括泛菌属、鞘氨醇单胞菌属等。因此，发酵产生的优势菌群是乳杆菌属，有利于青贮饲料品质的提升，而暴露空气则改变了菌群的菌属结构，滋生了有害菌群。

2.5 微生物群落的 Alpha 多样性分析

表 3 为全株玉米青贮期间和暴露空气后的 Alpha 多样性指数。Alpha 多样性用来表示样本内微生物群落的多样性，其中 Chao、Ace 是计算菌群丰度的指数，数值越大，表示菌群丰度越高；而 Simpson 和 Shannon 用来计算菌群多样性的指数，Shannon 值越大，群落多样

chinaXiv:201711.01785v1

性越低，Simpson 值越大，群落多样性越高。

表 3　不同样本的 Alpha 多样性指数

Table 3　Alpha diversity metrics of different samples

组别 Groups	Alpha 多样性指数 Alpha diversity metrics			
	Chao	Ace	Shannon	Simpson
F5	210.2	203.24	2.896	0.1240
F40	225.7	223.79	2.611	0.1513
A3	225.7	226.45	2.562	0.1738

Alpha 多样性分析表明，随着青贮的进行，菌群数量及组成呈现一定的变化。总体来说，3 个时期的样本序列数量较大，OTU 数目、Chao 值、Ace 值等指标上均处在较高的水平，说明样本菌群数量较大，多样性水平也相对较高。相比发酵前期，发酵后期及曝气期序列数量、OTU 数目、Chao 值、Ace 值等指标均有增长，而 Shannon 值有所降低，说明发酵促进了微生物群落的繁殖生长，并且使很多菌群物种得到了发展，因此微生物多样性得到了提高，菌群丰度也相应提高。

对于短期开袋暴露空气而言，其相对于发酵后期的序列数量、OTU 数目、Chao 值、Ace 值等指标的增幅均很小，Shannon 值的降幅也很小，表明短期开袋暴露空气后，在新的气体及温度环境下，菌群生长及物种多样性并没有产生太大变化。

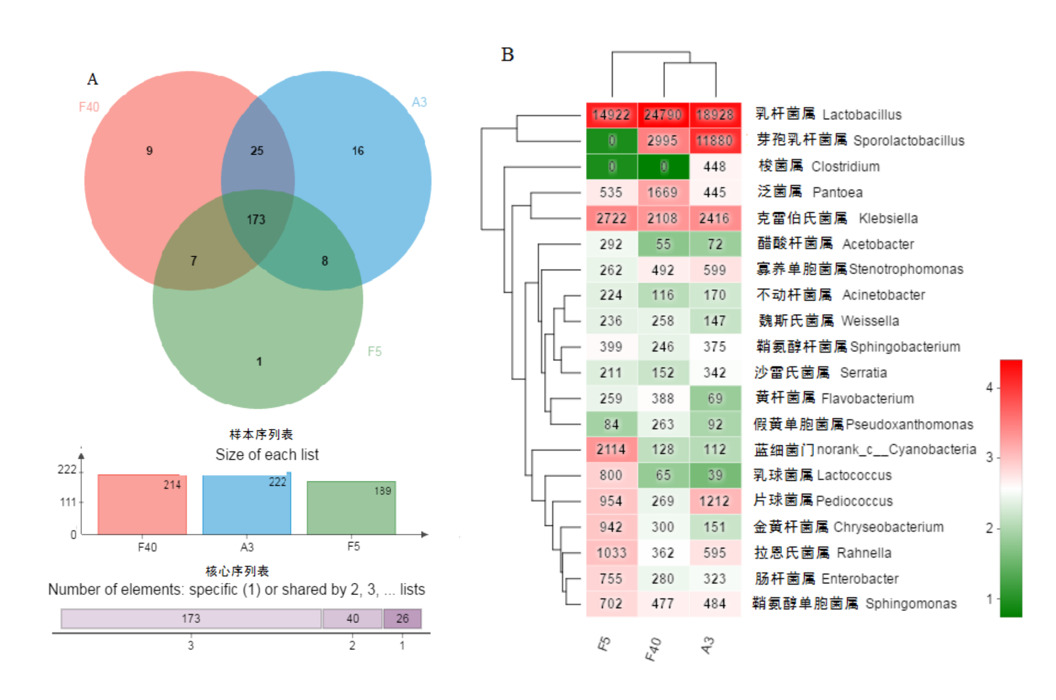
2.6 微生物群落的 Venn 图和 Heatmap 分析

由 Venn 图（图 5-A）可见，3 个样本的 239 个 OTU 中，有 173 个核心序列，占比为 73.49%，说明青贮期间和暴露空气后核心序列占比很大；发酵前期和发酵后期 2 个样本的 223 个 OTU 中，有 180 个核心序列，占比为 80.72%，占比有所增加；发酵后期和曝气期 2 个样本的 238，有 198 个核心序列，占比为 83.19%。F5、F40 和 A3 组的独有物种均很少，分别为 1、9 和 16 种。F5 组与 F40、A3 组共有物种较少，其值分别为 7 和 8；而 F40 组与 A3 组共有物种较多，为 25，表明这 2 个时期在物种组成上更为接近。总之，Venn 图分析显示 F40 组与 A3 组在微生物群落组成上更为接近，这说明开袋暴露空气 3 d 虽然改变了微生物群落组成，但仍然与发酵后期保持了较大的相似性，在一定程度上保证了青贮饲料的发酵品质。

微生物群落的 Heatmap（图 5-B）显示了在属水平上排名前 20 的物种丰度，图中不同色块的颜色代表了一个样品中对应一个菌属的丰度，色块内的数值为相应菌属含有的序列数。乳杆菌属在 3 个青贮时期内均保持了很深的色块深度，即丰度均很大。另外，克雷白氏杆菌属也保持了较好的连续性和较高的丰度，而芽孢乳杆菌属在发酵后期和曝气期色块颜色加深，尤其是在曝气期。梭菌属在曝气期突然出现，丰度也较高。由 Heatmap 还可以看出，大部

chinaXiv:201711.01785v1

分菌属在 3 个样本中均具有较好的连续性，仅少数菌属出现了中断（色块显示为绿色），表明发酵过程及发酵后开袋暴露空气 3 d 时乳酸菌等有益菌种类始终保持了优势地位，但也有个别菌属在丰度上随着发酵时间的持续及开袋后培养条件的改变出现了此消彼长变化。



Lactobacillus:乳杆菌属；*Klebsiella*:克雷伯氏菌属；*Rahnella*:拉恩菌属；*Chryseobacterium*:金黄杆菌属；*Pediococcus*:片球菌属；*Lactococcus*:乳球菌属；*Enterobacter*:肠杆菌属；*Sphingomonas*:鞘氨醇单胞菌属；*Pantoea*:泛菌属；*Sphingobacterium*:鞘氨醇杆菌属；*Sporolactobacillus*:芽孢乳杆菌属；*Stenotrophomonas*:寡养单胞菌属；*Flavobacterium*:黄杆菌属；*Clostridium*:梭菌属；*Acetobacter*:醋酸杆菌属；*Acinetobacter*:不动杆菌属；*Weissella*:魏斯氏菌属；*Serratia*:沙雷氏菌属；*Pseudoxanthomonas*:假黄单胞菌属。

图 5　全株玉米青贮期间和暴露空气后微生物群落的 Venn 图(A)和 Heatmap(B)分析

Fig.5　Venn map (A) and Heatmap (B) analysis of microbial community of whole-plant maize during ensilage and after air exposure

3 讨　论

全株玉米青贮与玉米秸秆青贮相比，营养价值高、适口性好、消化率高、能值高，可长期保存和四季均衡供应，是解决牛、羊等反刍动物所需青粗饲料的最有效途径。本试验从全株玉米青贮第 5 天、第 40 天和青贮 40 d 后开袋第 3 天每次取样时观察发现感官品质良好，色泽分别呈黄绿色、黄褐色和黄褐色，无霉变和粘手现象，有酒酸香味和无臭味。从全株玉米青贮的发酵品质来看，青贮发酵 40 d 后和青贮发酵 40 d 后短期开袋时氨态氮/总氮均低于 9%，pH 均低于 4.00，乳酸含量高于 9%，乙酸含量低于 3%，与 Zhou 等[20]报道在 20 或 25 ℃

chinaXiv:201711.01785v1

青贮发酵条件下全株玉米青贮的品质相似。综合考虑上述发酵品质指标，说明全株玉米青贮发酵 40 d 后具有较好的发酵品质。青贮发酵作用能够使全株玉米中 NDF 和 ADF 的含量下降，但也由于乳酸菌占主导的优势菌消耗了大量的可溶性糖类，使得 WSC 含量显著降低，这在本试验中也得到验证。因此，为进一步降低青贮全株玉米中 NDF 和 ADF 的含量，减少 WSC 消耗量，一些研究采取了在青贮饲料中添加糖类、纤维素酶或青贮添加剂等措施[21-23]，以改善青贮饲料的营养价值。

许多欧美国家已将全株玉米青贮作为奶牛和肉牛的全日粮饲料配方中不可或缺的一种粗饲料[24]，全株玉米青贮发酵过程和发酵完成后微生物群落组成及其丰度变化都很大，影响着青贮饲料的营养价值和品质[20,25]。Dolci 等[26]研究表明，青贮饲料发酵品质的好坏很大程度上取决于发酵初期的优良发酵菌种的数量和该菌种在整体菌群中占的比例。本研究采用 MiSeq 高通量测序技术对全株玉米青贮期间和暴露空气后微生物群落结构进行分析，发现全株玉米青贮第 5 天，乳杆菌属迅速发展成为优势菌群，丰度达到 49.78%，从而确立菌群发展的走势，其他菌株的繁殖受到抑制，随着发酵时间的延长，乳杆菌属进一步扩大其优势地位，在发酵后期，即青贮第 40 天时，其丰度达到了 64.46%，拥有绝对优势地位。这也为青贮饲料发酵品质的提升提供了菌群保障，乳杆菌属作为一种产乳酸菌（LAB），能够产生乳酸，降低青贮饲料 pH，抑制霉菌及其他有害杂菌的繁殖，增加青贮饲料的风味[27]。本研究中，全株玉米青贮发酵期间，乳杆菌属的丰度远大于陶莲等[14]报道的玉米秸秆青贮中乳杆菌属的丰度(9.73%)，由于青贮过程中氧气的耗尽，假单胞菌属（*Pseudomonas*）及霉菌等有害的需氧菌受到抑制，需氧菌属的丰度始终低于 1%。在本试验中，除丰度最高的乳杆菌属外，还存在数量较低的其他青贮饲料中常见的典型 LAB 菌种，如乳球菌属、片球菌属、肠球菌属（*Enterococcus*）和魏斯氏菌属（*Weissella*）等，但均未能成为优势菌群。

本研究表明，开袋曝露空气对全株玉米青贮微生物群落组成影响较大，开袋 3 d 后，乳杆菌属丰度下降严重，由发酵后期的 64.46%降为 45.34%，这是由于开袋后氧气含量增加，抑制了乳酸菌的繁殖生长，而一些好氧菌或兼性好氧菌得到了发展，如芽孢乳杆菌属，由青贮发酵后期的 7.79%上升到了 28.46%。有关芽孢乳杆菌属在青贮饲料中的报道的较少。Smoker[28]发现在实验室自然青贮窖条件下芽孢乳杆菌属可利用不同碳水化合物发酵产生乳酸，可作为青贮发酵剂。Kharaziana 等[29]研究发现在全株玉米青贮中添加土芽孢乳杆菌（*Sporolactobacillus terrae*）抑制一些植物致病真菌具有一定的作用。刘磊等[30]在肉仔鸡饲粮中添加 100 mg/kg 的芽孢乳杆菌能促进肠道发育，提高消化吸收功能，抑制其空肠内的大肠杆菌繁殖。但芽孢乳杆菌作为青贮发酵剂，对青贮饲料微生物菌群、发酵品质和反刍动物

chinaXiv:201711.01785v1

健康的作用机制还有待进一步研究。

全株玉米青贮发酵过程对隔绝空气的要求较为严格，如果空气泄露，会导致霉菌滋生，造成青贮饲料的霉变，饲料中养分被降解，产生有害霉菌毒素，危及牲畜安全[31-32]。Vissers等[33]报道，革兰氏阳性芽孢杆菌属（*Bacillus*）是青贮饲料中主要的腐败菌，主要降解蛋白质和氨基酸，在好氧条件下对青贮变质起重要作用，也是青贮开窖后短期内迅速发展起来的有害微生物，但在本研究中不论是青贮期间还是开袋后第 3 天均未出现芽孢杆菌属。但值得关注的是有害菌梭菌属，在开袋第 3 天其丰度达到 1.07%，可能对青贮品质产生不利影响。McDonald 等[34]在发酵品质较差的青贮饲料中发现有梭菌属，其在厌氧或微需氧条件下能分解糖、有机酸和蛋白质，是青贮有害微生物，这与本研究开袋曝露空气后出现梭菌属的结果一致。

本试验结果表明，克雷伯氏菌属在 3 个采样期内都保持了较高的丰度，对全株玉米青贮可能具有重要的作用，但目前有关这方面的报道较少，其具体作用机制及产生的作用还需要进一步研究。泛菌属、鞘氨醇单胞菌属等菌属丰度虽低，但在 3 个采样期中均存在，表明了它们在玉米青贮过程中持续起作用。肠杆菌属只在发酵初期出现，而寡养单胞菌属在发酵后期及曝气期出现，拉恩菌属在发酵前期及曝气期出现，说明青贮发酵及开袋暴露空气影响了某些菌群的发生。陶莲等[14]和 Dunière[35]均报道了青贮玉米中寡养单胞菌及鞘氨醇单胞菌属的存在，同本研究结果一致，说明这 2 种菌属在青贮玉米中是普遍存在的。

4 结　论

① 全株玉米经过 40 d 青贮发酵可使 pH 及 NDF、ADF 含量显著下降，乳酸含量显著升高，具有良好的发酵品质和营养价值，且发酵 40 d 后短时间开袋暴露空气对其发酵品质和营养价值无显著影响。

② 主成分分析显示 3 个发酵时期样本的微生物多样性差异很大，分属 3 个不同的群体，表明全株玉米青贮在发酵前期、发酵后期及曝气期微生物群落组成变化明显。

③ 在 3 个发酵时期的样本中，共鉴定出 16 个门，163 个属的细菌。基于门的水平，厚壁菌门和变形菌门始终占优势地位。基于属的水平，发酵前期优势菌群主要是乳杆菌属、克雷伯氏菌属和蓝细菌属，发酵后期优势菌群为乳杆菌属、芽孢乳杆菌属和克雷伯氏菌属，短时间开袋曝露空气后优势菌群为乳杆菌属、芽孢乳杆菌属和克雷伯氏菌属。

参考文献：

[1] BERTHIAUME R,MANDELL I,FAUCITANO L,et al.Comparison of alternative beef

chinaXiv:201711.01785v1

production systems based on forage finishing or grain-forage diets with and without promotants:1.Feedlot performance,carcass quality,and production costs[J].Journal of Animal Science,2006,84(8):2168–2177.

[2] HATEW B,BANNINK A,VAN LAAR H,et al.Increasing harvest maturity of whole-plant corn silage reduces methane emission of lactating dairy cows[J].Journal of Dairy Science,2016,99(1):354–368.

[3] ELLIS J L,BANNINK I K,HINDRICHSEN R D,et al.The effect of lactic acid bacteria included as a probiotic or silage inoculant on *in vitro* rumen digestibility,total gas and methane production[J].Animal Feed Science and Technology,2016,211:61–74.

[4] CARRILLO J A,HE Y H,LI Y K,et al.Integrated metabolomic and transcriptome analyses reveal finishing forage affects metabolic pathways related to beef quality and animal welfare[J].Scientific Reports,2016,6:25948,doi:10.1038/srep25948.

[5] LIN C J,BOLSEN K K,BRENT B E,et al.Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize[J].Journal of Applied Microbiology,2010,73(5):375–387.

[6] MUYZER G,DE WAAL E C,UITTERLINDEN A G.Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified gene encoding for 16S rRNA[J].Applied and Environmental Microbiology,1993,59(3):695–700.

[7] 韩吉雨,侯先志,杨凯,等.PCR–DGGE 方法分析内蒙古不同地区青贮玉米中乳酸菌群多样性[J].动物营养学报,2009,21(6):974–981.

[8] 王红梅,孙启忠,屠焰,等.呼伦贝尔草原野生牧草青贮中优良乳酸菌的分离及鉴定[J].草业学报,2016,25(8):189–196.

[9] CAPORASO J G,LAUBER C L,WALTERS W A,et al.Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms[J].The ISME Journal,2012,6(8):1621–1624.

[10] 张和平,于洁.乳酸菌基因组学研究新进展[J].中国食品学报,2016,16(2):1–8.

[11] JIANG Y,OGUNADE I M,QI S,et al.Effects of the dose and viability of Saccharomyces cerevisiae.1.Diversity of ruminal microbes as analyzed by Illumina MiSeq sequencing and quantitative PCR[J].Journal of Dairy Science,2017,100(1):325–342.

chinaXiv:201711.01785v1

[12] LI L H,SUN Y M,YUAN Z H,et al.Effect of microalgae supplementation on the silage quality and anaerobic digestion performance of Manyflower silvergrass[J].Bioresource Technology,2015,189:334–340.

[13] 刘晶晶.生物添加剂对柳枝稷青贮的作用及机理研究[D].博士学位论文.北京:中国农业大学,2015.

[14] 陶莲,刁其玉.青贮发酵对玉米秸秆品质及菌群构成的影响[J].动物营养学报,2016,28(1):198–207.

[15] BAO W C,MI Z H,XU H Y,et al.Assessing quality of *Medicago sativa* silage by monitoring bacterial composition with single molecule,real–time sequencing technology and various physiological parameters[J].Scientific Reports,2016,6:28358,doi:10.1038/srep28358.

[16] 万楚筠,钮琰星,黄凤洪,等.对羟基联苯比色法测定乳酸显色反应条件的研究[J].食品工业科技,2013,34(7):322–324,353.

[17] 张丽英.饲料分析及饲料质量检测技术[M].2 版.北京:中国农业大学出版社,2003:53–56,70–74.

[18] OWENS V N,ALBRECHT K A,MUCK R E,et al.Protein degradation and fermentation characteristics of red clover and alfalfa silage harvested with varying levels of total nonstructural carbohydrates[J].Crop Science,1999,39(6):1873–1880.

[19] DENNIS K L,WANG Y W,BLATNER N R,et al.Adenomatous polyps are driven by microbe-instigated focal inflammation and are controlled by IL-10-producing T cells[J].Cancer Research,2013,73(19):5905–5913.

[20] ZHOU Y,DROUIN P,LAFRENIÈRE C.Effect of temperature (5–25°C) on epiphytic lactic acid bacteria populations and fermentation of whole-plant corn silage[J].Journal of Applied Microbiology,2016,121(3):657–671.

[21] 兴丽,韩鲁佳,刘贤,等.乳酸菌和纤维素酶对全株玉米青贮发酵品质和微生物菌落的影响[J].中国农业大学学报,2004,9(5):38–41.

chinaXiv:201711.01785v1

[22] 许庆方,张翔,崔志文,等.不同添加剂对全株玉米青贮品质的影响[J].草地学报,2009,17(2):157–161.

[23] SANTOS A O,ÁVILA C L S,SCHWAN R F.Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage[J].Journal of Dairy Science,2013,96(12):7777–7789.

[24] MUCK R E.Recent advances in silage microbiology[J].Agriculture Food Science,2013,22(1):3–15.

[25] RANJIT N K,TAYLOR C C,KUNG L,Jr.Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation,aerobic stability and nutritive value of maize silage[J].Grass Forage Science,2002,57(2):73–81.

[26] DOLCI P,TABACCO E,COCOLIN L,et al.Microbial dynamics during aerobic exposure of corn silage stored under oxygen barrier or polyethylene films[J].Applied and Environmental Microbiology,2011,77(21):7499–7507.

[27] TOHNO M,KOBAYASHI H,NOMURA M,et al.Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from mixed pasture of timothy and orchardgrass,and its badly preserved silage[J].Journal of Animal Science,2002,83(4):318–330.

[28] SMOKER A N.Screening of *Sporolactobacillus* and *Bacillus* Strains for Use in Silage Inoculation[D].Master Thesis.Corvallis:Oregon State University,1999.

[29] KHARAZIANA Z A,JOUZANIA G S,AGHDAS M,et al.Biocontrol potential of *Lactobacillus* strains isolated from corn silages against some plant pathogenic fungi[J].Biological Control,2017,110(1):33–43.

[30] 刘磊,朱立贤.芽孢乳杆菌对肉仔鸡生产性能、肠道发育和微生物菌群的影响[J].动物营养学报,2011,23(12):2136–2142.

[31] DRIEHUIS F,ELFERINK S J W H O.The impact of the quality of silage on animal health and food safety:a review[J].Veterinary Quarterly,2000,22(4):212–216.

[32] WAMBACQ E,VANHOUTTE I,AUDENAERT K,et al.Occurrence,prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage:a review[J].Journal of the Science of Food and Agriculture,2016,96(7):2284–2302.

[33] VISSERS M M M,TE GIFFEL M C,DRIEHUIS F,et al.Minimizing the level of *Bacillus*

chinaXiv:201711.01785v1

ChinaXiv合作期刊

cereus spores in farm tank milk[J].Journal of Dairy Science,2007,90(7):3286–3293.

[34] MCDONALD P,HENDERSON A R,HERON S J E.The biochemistry of silage[M].2nd ed.Marlow:Chalcombe Publications, 1991:81–151.

[35] DUNIÈRE L,SINDOU J,CHAUCHEYRAS-DURAND F,et al.Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms[J].Animal Feed Science and Technology,2013,182(1/2/3/4):1–15.

Microbial Diversity of Whole-Plant Maize during Ensilage and after Air Exposure Analyzed by Metagenomics Technology

HU Zongfu[redacted]CHANG Jie Sarnhu WANG Sizhen NIU Huaxin*

(*College of Animal Science and Technology*, *Inner Mongolia University for the Nationalities*, *Tongliao* 028000, *China*)

Abstract: The objective of this experiment was to analyze the fermentation quality and microbial diversity of whole-plant maize during ensilage and after air exposure, and to monitor the dynamic changes of microbial community composition. There were 3 sampling time points in this experiment including fermentation at the 5th day (F5 group), fermentation at the 40th day (F40 group) and exposed air at the 3rd day after ensilage for 40 days (A3 group), and each sampling time point took 3 bags as 3 replicates. Microbial 16S rDNA V3 to V4 region of whole-plant maize during ensilage and after air exposure were sequenced by metagenomics technology, and the microbial community composition and abundance of 3 groups were compared. Alpha diversity and principal component analysis were carried out to investigate the microbial diversity of whole-plant maize during ensilage and after air exposure. The results showed that the contents of pH, NDF and ADF of the whole-plant maize after 40 days of silage fermentation were significantly decreased (P<0.05), and the lactic acid content was significantly increased (P <0.05), which had a good fermentation quality and nutritional value, and short-time exposed air after 40 days for silage had no significantly effects on fermentation quality and nutritional value（P>0.05）. A total of 122 371 high-quality effective sequences and 239 OTUs were obtained by Illumina Miseq sequencing platform, and totally 16 phyla, 163 genuses of bacteria were identified in samples of 3 groups. At the level of phylum, *Firmicutes* was dominant from beginning to end, and

*Corresponding author, professor, E-mail: niuhx@imun.edu.cn (责任编辑 菅景颖)

chinaXiv:201711.01785v1

ChinaXiv合作期刊

its abundance in F5, F40 and A3 groups was 57.57%, 74.65% and 78.82%, respectively, and showed a growth trend. Dominant species of the early stage for fermentation (F5 group), the late stage for fermentation (F40) and the aerobic period (A3 group) were *Lactobacillus*, which abundance was 49.78%, 64.46% and 45.34%, respectively, but the proportion of *Sporolactobacillus* in aerobic period was obvious increased by 28.46%. In conclusion, the natural fermentation of whole-plant maize silage significantly increases the abundance of *Lactobacillus*, which is beneficial to improve the fermentation quality of whole-plant maize silage, but exposed air at the 3rd day after ensilage has effect on the microbial diversity of whole-plant maize silage. By Miseq high-throughput sequencing technology, we can fully understand the changes of microbial community composition and abundance of whole-plant maize during ensilage and after air exposure.

Key words: silage; whole-plant maize; metagenomics; microbial diversity; fermentation quality

chinaXiv:201711.01785v1